

黄斑伊蚊感染及传播登革病毒的实验研究

唐士元 李国艾 张启恩

张泮河 王太华 张京生

(军事医学科学院微生物流行病学研究所)

摘要 通过直接叮吸微量培养板中细胞培养液的方法感染蚊虫,首次证明黄斑伊蚊(*Aedes (Stegomyia) flavopictus*)可传播登革病毒,蚊体感染率为24.6%,涎腺感染率为2.1%。上述结果表明黄斑伊蚊是登革热的潜在媒介,但媒介效能较低。

关键词 黄斑伊蚊 登革病毒 登革传播

登革热的主要媒介是埃及伊蚊(*Aedes (S.) aegypti*)和白纹伊蚊(*Ae. (S.) albopictus*)。从流行病学和实验感染两方面已证实为媒介的还有波利尼西亚伊蚊(*Ae. (S.) polynesiensis*)、赫布里底伊蚊(*Ae. (S.) hebrideus*)和盾纹伊蚊(*Ae. (S.) scutellaris*)。此外,里氏伊蚊(*Ae. (S.) riversi*)(江下優樹等,1978)、三列伊蚊(*Ae. (Protomaculosa) triseriatus*)(Prier & Grimstad, 1983)和中带伊蚊(*Ae. (Gymnometopae) mediovittatus*)(Gubler, 1984)也经实验感染证明可传播或从涎腺检出登革病毒或抗原,从而可认为是登革热的潜在媒介。

在我国,已知的媒介仅有埃及伊蚊和白纹伊蚊。本试验的目的是观察和白纹伊蚊同属一亚组,但分布不同的黄斑伊蚊(*Ae. flavopictus*)能否感染并传播登革病毒,从而判定其与传播登革热的关系。

材料和方法

一、蚊虫

1982年10月由沈阳市卫生防疫站提供的黄斑伊蚊蚊卵(采于鞍山千山树洞内),在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、RH $80 \pm 5\%$ 、光照14小时/天的养蚊室饲养7代以上。

二、病毒

登革II型病毒,新几内亚B株,经乳鼠脑传24代后在C6/36细胞中传29代以上。将保存于 -50°C 的感染C6/36细胞培养液连续传2代后,于第二天作为病毒液使用。

三、蚊虫感染

在 $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、RH $80 \pm 5\%$ 、光照14小时/天的养蚊室进行。先后采用了两种方法:

1. 泡沫塑料球法 取等量的肝素抗凝豚鼠血、病毒液和10% (W/V) 葡萄糖液共10.5ml,充分混匀。放入1个直径约3cm、重0.6g的泡沫塑料球,反复挤压使浸饱混合感染液。将球挂在盛有约250只雌蚊(蚊龄2—3天,饥饿15小时)的蚊笼内。1小时后

取出球,吸取少量混合液用 C6/36 细胞滴定病毒的 $TCID_{50}$ 。

2. 液滴法 取等量肝素抗凝豚鼠血和病毒液混匀后,再加入总量 1/10 的 100% (W/V) 葡萄糖液。混匀,吸取 2ml 均匀滴加于蚊笼上方的 60 目锦纶筛网上。1 小时后吸取部分混合液滴定病毒,其余用脱脂棉擦干。

四、挑选吸血蚊虫 先后采用两种方法:

1. 饥饿淘汰 在预备试验中曾观察到黄斑伊蚊耐饥能力较差,在 28°C 24 小时不喂食,约 90% 死亡。我们于感染前 15 小时撤食,感染后 9 小时开始喂糖水,此时,未吸混合液的蚊虫已饥饿 24 小时以上,绝大部分将死亡,存活的蚊虫留做观察。

2. 解剖镜下挑选 感染后将蚊虫吸出放冰上冻麻,于镜下逐个挑选吸血蚊虫放至另一蚊笼饲养观察。

五、观察

1. 传播试验 将经过 15 天外潜伏期的感染蚊虫,饥饿 3 小时后吸入另一个消毒处理过的蚊笼(前一天经蒸汽消毒 30 分钟,当天又经紫外线照射 2—3 小时)。取一块 40 孔微培板,每孔加 4 滴生长液和 4 滴 C6/36 细胞培养液后放入上述笼内。观察并记录每孔被叮咬次数。1 小时后取出微培板,封板,二天换液。每天观察细胞病变和污染情况,无病变和无杂菌生长的组 7 天后盲传一代,再观察 7 天。

2. 涎腺感染率 传播试验后取全部或部分蚊虫放入 4°C 冰箱冻麻 24 小时,解剖出涎腺放在暗底带圈的玻片上,丙酮固定 20 分钟,间接荧光抗体染色(第一抗体为本所四室提供的登革 II 型病毒单克隆抗体 2B8,使用浓度 1:120;荧光抗体为四室用异硫氰酸荧光黄标记的、本所生产组提供的羊抗鼠血清,使用浓度 1:64),镜检。每次试验均同时解剖 5 只同龄正常蚊虫涎腺作对照。

3. 蚊体感染率 取部分经过 15 天外潜伏期的感染蚊虫,放入 -50°C 冰箱 15~20 分钟冻死,用每毫升含有 1,000 单位青霉素和 $1,000\mu\text{g}$ 链霉素的生理盐水洗三次。1 或 2 只一组,加 0.2 或 0.4ml 生长液,研磨,离心,取上清液接种 4 孔 C6/36 细胞。每天观察病变,无病变的组,7 天后盲传一代。按阳性组数计算阳性率,再按照 Le 氏方法计算修正后的个体阳性率 (Le, 1981)。

共作了五次试验,概况见表 1。

表 1 五次试验概况

试验序号	感染液病毒浓度 ($TCID_{50}/0.025\text{ml}$)	感染方法	挑选吸血蚊虫方法	观察项目
1	$10^{6.75}$	泡沫塑料球	饥饿淘汰	蚊体感染率
2	$10^{6.50}$	泡沫塑料球	饥饿淘汰	蚊体感染率
3	$10^{6.00}$	液滴	解剖镜下	传播试验,涎腺感染率
4	$10^{6.50}$	液滴	解剖镜下	传播试验,涎腺感染率
5	$10^{7.00}$	液滴	解剖镜下	传播试验,涎腺感染率 蚊体感染率

结 果

一、传播试验和涎腺感染率

共作了三次试验(序号 3、4、5),其中两次在传播试验后检查了全部试验蚊虫的涎腺,两种方法所得结果一致。第三次全为阴性。第四次于传播试验后第三天,微培板中有一孔出现典型病变,涎腺荧光抗体染色也有 1 个阳性(表 2)。第五次试验共观察了 38 只蚊虫,传播试验后第五天,1 孔出现典型病变(图 1:A),盲传后第二天又 1 孔出现阳性(图:1:B)。这次试验共分离 27 只蚊虫(7 只阳性),仅部分蚊虫检查涎腺未获阳性,可能传播病毒的蚊虫已被分离病毒所用。

表 2 黄斑伊蚊传播登革病毒的结果

试验序号	观察蚊数	观察孔数	被叮吸孔数(%)	阳性孔数(%)	涎腺 IFA 检查数	涎腺阳性数
3	15	28①	11(39.3)	0	15	0
4	26	40	20(50.0)	1(5.0)	26	1
5	38	40	26(65.0)	2(7.7)	9	0

① 微培板 40 孔中仅 28 孔加了细胞培养液。



图 1 黄斑伊蚊经口感染登革 II 型病毒后 15 天叮吸微培板中的细胞培养液后出现的病变
A. 叮吸后 5 天出现病变。 B. 叮吸后第一代细胞阴性,盲传后 2 天出现病变。

从三次试验微培板的污染情况看,经过消毒处理的第三、五次试验,污染都较轻,孔污染率 <5%;第四次试验蚊笼未经处理,孔污染率达 27.5—42.5% (表 3),虽然也出现了 1 孔阳性,但如随蚊虫涎液排出的病毒量少,需盲传后才出现病变,则有可能因污染而影响结果的判断。

表 3 蚊虫直接叮吸细胞培养液后微培板的污染情况

试验序号	蚊 笼 号	蚊笼处理情况	观察蚊数	观察孔数	污染孔数(%)
3	1	消毒	15	28	1(3.4)
	2	消毒	9	28	0(0.0)
4	1	未消毒	26	40	11(27.5)
	2	未消毒	26	40	17(42.5)
5	1	消毒	38	40	2(5.0)
	2	消毒	37	40	1(2.5)

二、蚊体感染率

经泡沫塑料球感染饥饿淘汰筛选吸血蚊虫和经液滴感染解剖镜下挑选吸血蚊虫所得感染率分别为 24.1% 和 25.9%,基本相同。总阳性率按组计算为 22.7%,修正后个体阳

性率为 24.6% (表 4)。

表 4 黄斑伊蚊感染登革病毒的结果

感染方法	分离蚊虫只(组)数	阳 性 数	阳性率(%)	修正后个体阳性率(%)
泡沫塑料球	127(89) ^①	28	22.0	24.1
液 滴	27(27)	7	25.9	—
合 计	154(116)	35	22.7	24.6

① 其中 38 组为每组 2 只。

从 3 组 5 只雄蚊也获得 1 组阳性。

讨 论 与 小 结

1. 江下優樹等(1981)曾证明登革 II 型病毒可在黄斑伊蚊体内繁殖, 但传播试验未获阳性。我们用感染蚊虫直接叮吸微培板中细胞培养液的方法, 首次证明黄斑伊蚊经口感染登革 II 型病毒后 15 天即可传播。用间接荧光抗体染色检测, 其涎腺感染率为 2.1%, 说明黄斑伊蚊也是登革热的潜在媒介, 但媒介效能较低。这种伊蚊分布于黑龙江、吉林、辽宁三省(陆宝麟等, 1987), 在某些地区如鞍山市的千山和凤城县的凤凰山游览区, 该蚊为优势种, 辽宁地区以往记录的“白纹伊蚊”绝大多数为黄斑伊蚊(陈继寅, 1983)。本试验结果提出: 在上述地区虽然没有已知的登革热媒介——白纹伊蚊和埃及伊蚊, 但如有传染源进入, 也应注意, 发生登革热流行的可能性。

2. 黄斑伊蚊经口感染登革 II 型病毒后 15 天, 全蚊匀浆分离感染率为 24.6%, 稍低于用同样方法感染的白纹伊蚊的感染率 31.6%; 而涎腺感染率则差别显著, 黄斑伊蚊仅 2.1%, 白纹伊蚊为 18.6% ($P < 0.05$), 说明黄斑伊蚊的媒介效能低于白纹伊蚊。

根据 Kramer 等(1981); Hardy 等(1983)的报道, 病毒被蚊虫吸入后, 首先需要突破中肠感染屏障, 在中肠上皮细胞中繁殖, 再突破中肠释放屏障进入体腔, 突破涎腺感染屏障进入涎腺。只有涎腺受染的蚊虫, 才有可能成为媒介。Gubler 等(1984)将埃及伊蚊感染登革病毒后, 用荧光抗体染色检查头压片和涎腺, 所得结果完全一致, 表明至少在他所做试验的条件下, 似乎不存在涎腺感染屏障。我们观察 26 只接种感染的白纹伊蚊涎腺, 荧光抗体染色全部阳性, 也没有证明存在涎腺感染屏障; 而 3 只接种感染的黄斑伊蚊的涎腺全为阴性, 虽然数量较少, 但至少可认为登革病毒进入该蚊体腔后, 涎腺不一定受染, 亦即可能存在涎腺感染屏障。根据上述文献和我们的结果分析, 黄斑伊蚊的媒介效能较低, 可能涎腺感染屏障起一定的作用, 而中肠感染屏障的影响较小。

3. 采用感染蚊虫直接叮吸微培板中正常细胞培养液的方法作定性传播试验, 简便易行, 不需将蚊虫的叮吸液再接种细胞或动物, 既减少了操作程序, 又可减少随涎液排出的病毒损失。蚊笼经过消毒处理后, 微培板暴露 1 小时, 孔污染率 $< 5\%$, 基本不影响病变的观察。

参 考 文 献

- 陈继寅 1983 辽宁省白纹伊蚊亚组伊蚊的分布。白纹伊蚊和埃及伊蚊防制研究第一集 7—8。
陆宝麟、苏龙 1987 我国伊蚊鉴定手册。科学出版社。

- 江下優樹等 1978 ヲベーズシマカのデングウイルスに対する感受性。衛生動物 29(1): 8。
- 江下優樹等 1981 ヲアカ亜属のデングウイルス媒介能。衛生動物 32(2): 155。
- Fricker J. E. & Grimstad P. R. 1983 Transmission of dengue virus by orally infected *Aedes triseriatus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32(6): 1429—34.
- Gubler D. J. et al. 1984 Studies on dissemination and salivary gland barriers to dengue infection in *Aedes aegypti*. *Arbovirus Information Exchange* March: 145—50.
- Hardy J. L. et al. 1983 Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Ann. Rev. Entomol.* 28: 229—62.
- Kramer L. D. et al. 1981 Dissemination barriers for western equine encephalomyelitis virus in *Culex tarsalis* infected after ingestion of low viral doses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(1): 190—7.
- Le C. T. 1981 A new estimator for infection rates using pools of variable size *Am. J. Epidemiol.* 114(1): 132—6.

EXPERIMENTAL INFECTION AND TRANSMISSION OF DENGUE VIRUS BY *Aedes flavopictus*

TANG SHI-YUAN LI GUO-AI ZHANG QI-EN ZHANG PAN-HE

WANG TAI-HUA ZHANG JING-SHENG

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences)

Transmission of dengue virus by orally infected *Aedes (S.) flavopictus* was proved for the first time by using the method of direct imbibition of cell medium. The infection rates of the whole mosquito and the salivary gland were 24.6% and 2.1% respectively, showing that *Aedes flavopictus* is a potential vector of dengue fever, but its vector efficiency is low as displayed by its low rate of salivary gland infection.

Key words *Aedes flavopictus* —dengue virus—dengue transmission